

⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑯ Offenlegungsschrift
⑯ DE 196 07 702 A 1

⑯ Int. Cl. 6:
C 07 D 309/32
C 12 P 17/06
A 61 K 31/365
// C07D 521/00

⑯ Aktenzeichen: 196 07 702.8
⑯ Anmeldetag: 29. 2. 96
⑯ Offenlegungstag: 4. 9. 97

DE 196 07 702 A 1

⑯ Anmelder:

Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
(GBF), 38124 Braunschweig, DE

⑯ Vertreter:

Patentanwälte Dr. Boeters, Bauer, Dr. Meyer, 81541
München

⑯ Erfinder:

Reichenbach, Hans, Prof. Dr., 38124 Braunschweig,
DE; Höfle, Gerhard, Prof. Dr., 38124 Braunschweig,
DE; Gerth, Klaus, Dr., 38124 Braunschweig, DE;
Washausen, Peter, Dr., 38124 Braunschweig, DE

⑯ Heterozyklische Verbindungen, Herstellungsverfahren und Mittel

⑯ Die Verbindung betrifft neue heterozyklische Verbindungen, die auch als Jerangolide bezeichnet werden, sowie ein Verfahren zu ihrer Gewinnung und Mittel mit einem Gehalt an den genannten Verbindungen.

DE 196 07 702 A 1

BEST AVAILABLE COPY

Beschreibung

Die Verbindung betrifft neue heterozyklische Verbindungen, die im folgenden auch als Jerangolide bezeichnet werden. Eine dieser Verbindungen, und zwar Jerangolid A, ist bereits in J. Antibiotics, 49 (1) (1996) 71–75 vorgeschlagen worden, wobei jedoch weder ein Weg zur mikrobiologischen noch zur vollsynthetischen Gewinnung aufgezeigt wurde. Der Zugang ist erst mit Hilfe des Produktionsstammes DSM 10 497 der Spezies *Sorangium cellulosum* möglich, wobei dieser Stamm im folgenden noch näher beschrieben wird.

Nachstehend wird die Erfindung anhand experimenteller Daten und zweier Figuren näher beschrieben.

10 A Produktionsbedingungen

A.1. Produktionsstamm

15 *Sorangium cellulosum* gehört zur Ordnung der Myxococcales, Unterordnung Sorangineae, Familie Polyangia-
ceae. Der Produktionsstamm *Sorangium cellulosum* So ce307 wurde 1987 aus einer Bodenprobe aus Jerusalem
isoliert. Der Stamm ist bei der deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM) unter DSM 10 497 hinterlegt.

A.2. Stammkultur und morphologische Beschreibung

20 Stammkulturen werden gehalten auf VY/2-Agar (0,5% Bäckerhefe nach Frischgewicht; 0,1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,5% Agar; pH 7,2) oder auf Filterpapier über ST21-Agar (0,1% KNO_3 ; 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,1% K_2HPO_4 ; 0,01% $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,02% FeCl_3 ; 0,002% Hefeextrakt; Standard-Spurenelementlösung, z. B. nach G. Drews, Mikrobiologisches Praktikum, 2. Auflage, S. 6. Berlin: Springer Verlag (1974); 1% Agar. Die Platten werden bei 30 °C bebrütet.

25 Auf Filterpapier über Mineralsalzagar oder auf Hefeagar (VY/2-Agar) bildet der Stamm große hell orange Schwarmkolonien mit vielen gelborangen bis schwarzbraunen Fruchtkörpern. Letztere bestehen aus kleinen Sporangiolen von 15–20 µm Durchmesser, die in mehr oder weniger großen Haufen dicht gepackt liegen; die Haufen messen meist zwischen 50 und 150 µm Durchmesser. Die vegetativen Stäbchen haben die für *Sorangium* typische Form: relativ derbe, im Phasenkontrastmikroskop dunkle, zylindrische Stäbchen mit breit abgerundeten Enden, im Mittel 3–6 µm lang und um 1 µm dick. Nach längerer Adaptation an das Wachstum in Flüssigme-
dien wächst der Stamm in homogener Zellsuspension.

A.3. Leistungen

35 Der Stamm So ce307 produziert etwa 20 chemisch verwandte Verbindungen. Die Hauptkomponenten, die Jerangolide A bis E hemmen das Wachstum zahlreicher Pilze und Hefen (siehe unter B.1.). Gegen alle getesteten Bakterien waren die Wirkstoffe unwirksam. Die Wirkstoffe können sowohl aus den Zellen als auch aus dem Kulturüberstand isoliert werden.

40 A.4. Produktion der Aktivitäten

Die Wirkstoffe werden während der logarithmischen bis hin zur stationären Wachstumsphase produziert, wobei das Produktspektrum jedoch sehr davon abhängig ist, ob die Kultivierung in Gegenwart eines Adsorberharzes oder ohne Harz durchgeführt wurde.

45 Eine typische Fermentation verläuft folgendermaßen: Ein 100 l Bioreaktor der Firma Giovannola, Monthey, Schweiz, wird mit 60 l Produktionsmedium gefüllt (Medium in g/l: Kartoffelstärke, 10; Glucose, 1; Sojabohnenmehl entfettet, 5; Hefeextrakt, 2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1; Ethyldiamintetraacetat, Eisen(III)-Natriumsalz, 0,008; pH 7,2). Bei Fermentation in Gegenwart von Adsorberharz werden zusätzlich 2% (v/v) XAD-16 (Rohm und Haas, Frankfurt/M) vor dem Autoklavieren zugegeben. Angeimpft wird mit 3 Litern einer 4 Tage alten Vorkultur. Die Fermentation läuft mindestens 4 Tage bei 32 °C, einer Belüftung von 0,15 vvm und einer Rührergeschwindigkeit von 250 upm. Mit 10 % KOH wird der pH-Wert bei 7,2 gehalten. Schaumbildung wird durch Zugabe von Silikon Antischaum (Tegosipon, Goldschmidt AG, Essen) verhindert. Bei Fermentation ohne Adsorberharz werden am Ende der Fermentation 2% XAD-16 unsteril in den Bioreaktor gegeben und dieser für drei Stunden unter den Fermentationsbedingungen weiter inkubiert.

55 Die Wirkstoffe bei beiden Fermentationen sind quantitativ an das Adsorberharz gebunden, welches durch Absieben des Reaktorinhaltes über ein Sieb mit 0,2 mm Maschenweite gewonnen wird.

Die methanolischen XAD-Eluate beider Fermentationen werden unter folgenden Bedingungen mittels HPLC analysiert.

Säule: 125 mm Länge und 2 mm Innendurchmesser

60 Trennmaterial: Nucleosil 120-5C18 (Macherey-Nagel, Düren)

Trenntemperatur: 70 °C

Laufmittelfluß: 0,5 ml/min

Gradient: Methanol/Wasser = 45/55 vom Zeitpunkt Null bis zur 7. Minute. Anschließend linearer Anstieg auf Methanol/Wasser = 70/30 bis zur 20. Minute. Bis zur 26. Minute bleibt das Methanol/Wasser-Verhältnis konstant auf 70/30. Bis zur 30. Minute linearer Anstieg auf Methanol/Wasser = 90/10. Detektion: bei 255,4 nm.

Abb. 2

HPLC-Analyse einer typischen Fermentation ohne XAD.

Abb. 3

5

HPLC-Analyse einer typischen Fermentation in Gegenwart von XAD.

Wirkung

10

B.1. Hemmspektrum von Jerangolid A im Plattendiffusionsstest sowie MIC Werte, bestimmt im
Reihenverdünnungstest

Testorganismus	Durchmesser des Hemmhofes ^a (mm)	MHK (μ g/ml)	15
<i>Absidia glauca</i> CBS ^c 100,59	45		20
<i>Mucor hiemalis</i> DSM ^b 2655	40	0,07	
<i>Athelia rolfsii</i>	25		
<i>Nematospora coryli</i> CBS 2608	--		
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> Tü ^d 501	--		
<i>Nadsonia fulvescens</i> CBS 2596	--		25
<i>Hansenula anomala</i> DSM 70130	35	0,07	
<i>Pichia membranaefaciens</i> DSM 70366	30	0,4	
<i>Debaryomyces hansenii</i> DSM 70238	18	0,4	
<i>Lipomyces lipofer</i> DSM 70305	--		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BT 27C-2A YGSC ^e	--		30
<i>Aspergillus clavatus</i> CBS 121.45	--		
<i>Penicillium capsulatum</i> CBS 301.48	52		
<i>Alternaria solani</i> DSM 2954	10		
<i>Chaetomium cochlioides</i> DSM 1909	10		35
<i>Fusarium oxysporum</i> DSM 2018	25		
<i>Trichoderma hamata</i>	40	7,0	
<i>Cladosporium resinae</i> DSM 63423	33		
<i>Botrytis cinerea</i> DSM 877	40	7,0	
<i>Sclerotina sclerotiorum</i> DSM 1946	28		40
<i>Psilocybe montana</i> CBS 703.20	--		
<i>Candida albicans</i> CBS 1893	14	4,2	
<i>Rhodotorula glutinis</i> DSM 70398	--		
<i>Trichosporon terrestris</i> CBS 66.97	50	0,13	45

^a Testblättchen (6 mm Durchmesser) mit 10 μ g Jerangolid A

50

^b Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Braunschweig^c Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn^d Stammsammlung, University Tübingen

55

^e Yeast Genetic Stock Center of BerkeleyDie Verbindungen zeigen gute Wirksamkeit sowohl gegen humanpathogene wie gegen phytopathogene Pilze
und Hefen.

60

Isolierung der Jerangolide

Die aus einem 100 Liter Fermentationsansatz abgetrennten 3 Liter Adsorberharz werden in eine Glassäule (10 cm Durchmesser) gefüllt und mit 20 Liter Methanol innerhalb von 3,5 h eluiert. Die ersten 5 Liter Eluat werden wegen des hohen Wassergehaltes separat aufgearbeitet: Das Eluat wird im Vakuum bis zur Wasserphase eingeeengt und viermal mit je 1 Liter Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten Dichlormethanphasen werden mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft.

Die restlichen methanolischen Eluatfraktionen werden vereinigt, bis auf ein Volumen von ca. 1 Liter eingeeengt und mit dem Extrakt der ersten 5 Liter Eluat vereinigt. Zur Entfernung der Lipide wird diese methanolische Extraktlösung dreimal mit 600 ml Heptan extrahiert. Die gesammelten Heptanphasen werden anschließend mit 400 ml MeOH reextrahiert.

5 Nach dem Eindampfen der vereinigten Methanolphasen werden 30,9 g eines dunkelbraunen ölichen Extraktes erhalten. Dieser wird in Methanol gelöst, auf 300 ml Kieselgel 60 (0,063–0,2 mm Korngröße) aufgegeben und mit 650 ml Methanol eluiert. Nach dem Einengen des Eluats im Vakuum werden 28,3 g eines braunroten ölichen Zwischenproduktes (Antibiotika-Komplex) erhalten.

10 Trennung der Komponenten

Das oben erhaltene Zwischenprodukt wird in 100 ml MeOH gelöst und in drei Läufen auf einer präparativen HPLC-Anlage Typ "Merck Prepbar" getrennt (Säulenabmessungen: 400 x 100 mm; Säulenmaterial: RP 18, 10 μ ; Laufmittel: 17 Liter MeOH/H₂O 72/28, dann 5 Liter Methanol; Flußrate: 130 ml/min; Detektion: 240 nm) Es werden vier Fraktionen aufgefangen:

1. Fraktion 4 Liter
2. Fraktion 7 Liter
3. Fraktion 6 Liter
20 4. Fraktion 5 Liter

Die entsprechenden Fraktionen der drei Läufe werden vereinigt. Die 2. Fraktion enthält polare Jerangolide, darunter Jerangolid B. Die 3. Fraktion enthält Jerangolid A als Hauptkomponente der Fermentation. Die lipophileren Jerangolide D, E und H befinden sich in der 4. Fraktion. Die Trennung der Jerangolide in den Fraktionen 2 und 4 erfolgt durch RP-MPLC (Säule: 40 x 460 mm, YMC-RP 18, 120, 15–25 μ ; Laufmittel: MeOH/H₂O 75/25 (2) bzw. 80/20 (4); Detektion: 254 nm)

Retentionszeiten der Jerangolide in der analytischen RPLC gemäß Fig. 3 (Bedingungen siehe unter A.4.)

	Antibiotikum	Ausbeute (mg)	Rt (min)
30	Jerangolid A	11 200	14,4
35	Jerangolid B	390	12,3
40	Jerangolid D	590	23,9
45	Jerangolid E	1 600	27,9
50	Jerangolid H	470	18,0

Charakterisierung

45 Jerangolid A

Struktur: Abb. 1.-

50 UV (Methanol): λ_{max} (lg ϵ) = 204 (4,06), 249 (3,94).-
IR (KBr): ν = 3425 (s), 2964 (s), 2933 (m), 2874 (w), 1694 (s), 1635 (s) 1381 (2), 1239 (m).-
¹H- und ¹³C-NMR: s. Tabelle 1.-
C22H32O5 Ber. 376,2250 Gef. 376,2227 [(+)]DCI-MS].-

55 Jerangolid B

Struktur: Abb. 1.-

50 UV (Methanol): λ_{max} (lg ϵ) = 203 (3,77), 252 (3,64).-
IR (KBr): ν = 3438 (s), 2963 (s), 2933 (s), 2873 (m), 1697 (s), 1644 (s), 1385 (s), 1238 (m), 1128 (m), 1100 (s).-
¹H und ¹³C-NMR: s. Tabelle 2.-
C22H34O5 Ber. 378,2406 Gef. 378,2391 [(+)]DCI-MS].-

Jerangolid D

65 Struktur: Abb. 1.-

UV (Methanol): λ_{max} (lg ϵ) = 204 (4,18), 252 (4,05).-

DE 196 07 702 A1

IR (KBr): ν = 3436 (s), 2981 (m), 2959 (m), 2928 (m), 2888 (w), 2870 (w), 1691 (s), 1641 (s), 1384 (m), 1312 (w), 1236 (m), 1119 (m), 1098 (m).-

^1H und ^{13}C -NMR: s. Tabelle 3.-

$\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_4$ Ber. 360,2301 Gef. 360,2276 [(+)-DCI-MS].

5

Jerangolid E

Struktur: Abb. 1.-

UV (Methanol): $\lambda_{\text{max}}(\lg \epsilon)$ = 203 (4,14), 253 (4,08)-

IR (KBr): ν = 3441 (m), 2981 (w), 2961 (m), 2923 (m), 1695 (s), 1641 (s), 1460 (w), 1384 (m), 1312 (m), 1232 (m), 1125 (m), 1078 (m).-

^1H und ^{13}C -NMR: s. Tabelle 4.-

$\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_4$ Ber. 362,2457 Gef. 362,2432 [(+)-DCI-MS].

10

15

Jerangolid H

Struktur: Abb. 1.-

^1H und ^{13}C -NMR: s. Tabelle 5.-

$\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_5$ (+)-ESI-MS(M + H⁺) = 379.-

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

DE 196 07 702 A1

Tabelle 1. NMR-Daten von Jerangolid A in Methanol-D₄¹H: 600 MHz; ¹³C: 150 MHz

	H	δ_{H}	m	J	C	δ_{C}	m
5	-	-.-	-		1	170.28	s
10	-	-.-	-		2	107.35	s
15	-	-.-	-		3	172.58	s
20	4-H _a	2.67	dd	4.7, 17.2	4	30.53	t
25	4-H _b	2.60	dd	10.9, 17.3	4	30.53	t
30	5-H	4.80	dddd	4.7, 10.9, 6.8, 1.0	5	76.84	d
35	6-H	5.53	ddd	15.5, 6.8, 1.5	6	126.20	d
40	7-H	5.81	ddd	1.0, 6.2, 15.4	7	140.43	d
45	8-H	3.14	qddd	1.5, 6.9, 6.9, 8.6	8	35.83	d
50	9-H	5.26	qdd	1.3, 1.4, 9.0	9	129.31	d
55	-	-.-	-		10	137.31	s
60	11-H	3.84	dd	2.8, 10.9	11	79.23	d
65	12-H _a	2.13	m		12	31.16	t
70	12-H _b	1.95	m		12	31.16	t
75	13-H	5.57	qd	1.5, 6.3	13	122.01	d
80	-	-.-	-		14	136.29	s
85	15-H	4.10	m		15	79.54	d
90	16-H _a	1.78	qdd	7.3, 14.4, 3.6	16	26.60	t
95	16-H _b	1.54	qdd	7.2, 14.3, 0.9	16	26.60	t
100	17-H ₃	0.91	dd	7.3, 7.2	17	8.73	q
105	18-H _a	4.43	d	12.4	18	54.03	t
110	18-H _b	4.36	d	12.4	18	54.03	t
115	19-H ₃	3.84	s		19	56.78	q
120	20-H ₃	1.11	d	6.8	20	20.95	q
125	21-H ₃	1.66	d	1.5	21	12.84	q
130	22-H ₃	1.60	dd	1.1, 2.4	22	19.05	q
135	18-OH	*2.80	s		-	-.-	-

* gemessen in CDCl₃

DE 196 07 702 A1

Tabelle 2. NMR-Daten von Jerangolid B in Methanol-D₄¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz

H	δ_{H}	m	J	C	δ_{C}	m
-	-.-	-		1	171.36	s
-	-.-	-		2	102.73	s
-	-.-	-		3	169.31	s
4-H _a	2.88	dd	4.2, 17.4	4	30.32	t
4-H _b	2.67	m		4	30.32	t
5-H	4.86	m		5	76.93	d
6-H	5.63	ddd	1.2, 6.6, 15.5	6	126.38	d
7-H	5.87	dd	6.2, 15.6	7	140.28	d
8-H	3.22	m		8	35.84	d
9-H	5.34	dd	1.2, 9.1, br.	9	128.86	d
-	-.-	-		10	137.48	s
11-H	3.69	d	10.7, br.	11	83.53	d
12-H _a	1.66	m		12	22.71	t
12-H _b	1.62	m		12	22.71	t
13-H _a	1.83	m		13	39.20	t
13-H _b	1.69	m		13	39.20	t
-	-.-	-		14	69.28	s
15-H	3.13	dd	2.7, 9.9	15	86.92	d
16-H _a	1.87	m		16	27.42	t
16-H _b	1.59	m		16	27.42	t
17-H ₃	1.02	dd	7.4, 7.4	17	11.39	q
18-H ₃	1.74	s		18	8.79	q
19-H ₃	3.88	s		19	56.32	q
20-H ₃	1.13	d	6.8	20	21.02	q
21-H ₃	1.73	d	1.2	21	13.61	q
22-H ₃	1.13	s		22	25.84	q

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabelle 3. NMR-Daten von Jerangolid D in Methanol-D₄¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz

	H	δ_{H}	m	J	C	δ_{C}	m
5	-	--	-		1	171.35	s
10	-	--	-		2	102.71	s
15	-	--	-		3	169.32	s
4-H _a	2.88	ddd		0.7, 4.0, 17.3	4	30.30	t
4-H _b	2.67	ddq		2.0, 11.4, 17.4	4	30.30	t
5-H	4.85	m			5	76.89	d
20	6-H	5.63	ddd	1.3, 6.6, 15.3	6	126.41	d
7-H	5.87	ddd		0.8, 6.5, 15.3	7	140.20	d
25	8-H	3.23	m		8	35.82	d
9-H	5.33	ddq		1.1, 1.2, 9.1	9	129.36	d
30	-	--	-		10	137.27	s
11-H	3.88	dd		3.2, 10.3	11	79.24	d
35	12-H _a	2.14	m		12	31.15	t
12-H _b	1.95	m			12	31.15	t
40	13-H	5.63	m		13	122.00	d
-	--	--			14	136.28	s
45	15-H	4.13	s	br.	15	79.52	d
16-H _a	1.81	m			16	26.59	t
16-H _b	1.58	m			16	26.59	t
50	17-H ₃	0.94	dd	7.3, 7.4	17	*8.71	q
18-H ₃	1.75				18	*8.79	q
19-H ₃	3.88	s			19	56.32	q
55	20-H ₃	1.14	d	6.8	20	20.96	q
21-H ₃	1.71	d	1.1		21	12.80	q
60	22-H ₃	1.64	m		22	19.03	q

* Die Werte können getauscht werden

DE 196 07 702 A1

Tabelle 4. NMR-Daten von Jerangolid E in Methanol-D₄¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz

H	δ_{H}	m	J	C	δ_{C}	m
-	-.-	-		1	171.37	s
-	-.-	-		2	102.72	s
-	-.-	-		3	169.32	s
4-H _a	2.88	ddq	4.1, 17.3, 0.8	4	30.31	t
4-H _b	2.67	ddq	11.3, 17.3, 2.0	4	30.31	t
5-H	4.83	dd	4.4, 6.7, br.	5	76.92	d
6-H	5.63	ddd	1.4, 6.6, 15.6	6	126.37	d
7-H	5.87	ddd	0.8, 6.2, 15.6	7	140.28	d
8-H	3.21	m		8	35.81	d
9-H	5.29	ddq	1.2, 1.3, 9.1	9	128.89	d
10-H	-.-	-		10	137.82	s
11-H	3.67	d	10.8, br.	11	83.48	d
12-H _a	1.68	m		12	31.96	t
12-H _b	1.48	m		12	31.96	t
13-H _a	1.86	m		13	34.25	t
13-H _b	1.30	m		13	34.25	t
14-H	1.35	m		14	35.62	d
15-H	2.96	dddd	2.8, 7.8, 9.2	15	85.92	d
16-H _a	1.75	m		16	26.87	t
16-H _b	1.44	m		16	26.87	t
17-H ₃	0.99	dd	7.3, 7.5	17	9.88	q
18-H ₃	1.74	dd	1.0, 1.7	18	8.78	q
19-H ₃	3.88	s		19	56.31	q
20-H ₃	1.13	d	6.9	20	20.99	q
21-H ₃	1.69	d	1.3	21	13.35	q
22-H ₃	0.87	d	6.4	22	17.99	q

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

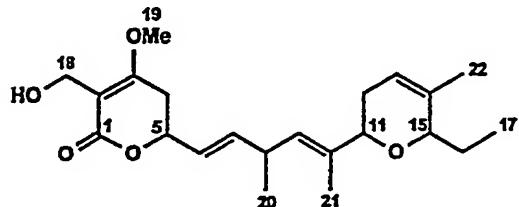
Tabelle 5. NMR-Daten von Jerangolid H in Methanol-D₄¹H: 300 MHz; ¹³C: 75 MHz

	H	δ_{H}	m	J	C	δ_{C}	m
5	-	-.-	-		1	170.34	s
10	-	-.-	-		2	107.33	s
15	-	-.-	-		3	172.63	s
20	4-H _a	2.95	dd	4.2, 17.5	4	30.53	t
25	4-H _b	2.73	dd	11.3, 17.6	4	30.53	t
30	5-H	4.88	m		5	76.89	d
35	6-H	5.64	ddd	1.4, 6.7, 15.5	6	126.16	d
40	7-H	5.89	ddd	1.0, 6.4, 15.5	7	140.52	d
45	8-H	3.22	m		8	**35.84	d
50	9-H	5.30	ddq	1.3, 1.4, 9.0	9	128.86	d
55	-	-.-	-		10	137.85	s
60	11-H	3.68	d	10.1, br.	11	83.48	d
65	12-H _a	1.68	m		12	31.96	t
70	12-H _b	1.49	m		12	31.96	t
75	13-H _a	1.85	m		13	34.26	t
80	13-H _b	1.28	m		13	34.26	t
85	14-H	1.34	m		14	**35.64	d
90	15-H	2.96	m		15	85.94	d
95	16-H _a	1.76	dq	2.9, 7.4	16	26.88	t
100	16-H _b	1.44	m		16	26.88	t
105	17-H ₃	0.99	dd	7.3, 7.4	17	9.91	q
110	18-H _a	4.34	s	br.	18	54.01	t
115	18-H _b	4.34	s	br.	18	54.01	t
120	19-H ₃	3.93	s		19	56.76	q
125	20-H ₃	1.13	d	6.8	20	20.98	q
130	21-H ₃	1.70	d	1.4	21	13.39	q
135	22-H ₃	0.87	d	6.2	22	18.01	q
140	*18-OH	2.87	s		-	-	-

* gemessen in [D₆]-DMSO; **die Werte können getauscht werden

Patentansprüche

1. Verbindung der folgenden allgemeinen Formel (Jerangolid A):



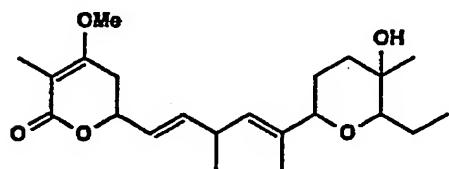
Jerangolid A

5

10

15

2. Verbindung der folgenden allgemeinen Formel (Jerangolid B):



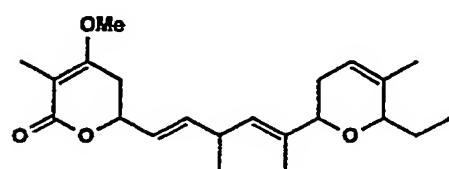
20

25

Jerangolid B

3. Verbindung der folgenden allgemeinen Formel (Jerangolid D):

30



35

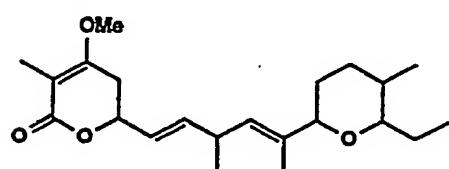
40

Jerangolid D

4. Verbindung der folgenden allgemeinen Formel (Jerangolid E):

45

50



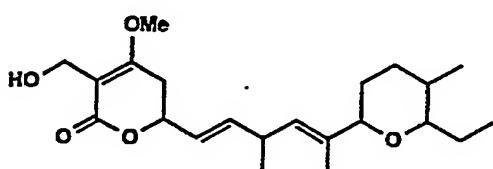
Jerangolid E

5. Verbindung der folgenden allgemeinen Formel (Jerangolid H):

55

60

65



Jerangolid H

6. Heterozyklische Verbindung, gewinnbar aus Sorangium cellulosum DSM 10 497 und mit dem NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1.

7. Heterozyklische Verbindung, gewinnbar aus Sorangium cellulosum DSM 10 497 und mit dem NMR-Spektrum gemäß Tabelle 2.

5 8. Heterozyklische Verbindung, gewinnbar aus Sorangium cellulosum DSM 10 497 und mit dem NMR-Spektrum gemäß Tabelle 3.

9. Heterozyklische Verbindung, gewinnbar aus Sorangium cellulosum DSM 10 497 und mit dem NMR-Spektrum gemäß Tabelle 4.

10. Heterozyklische Verbindung, gewinnbar aus Sorangium cellulosum DSM 10 497 und mit dem NMR-Spektrum gemäß Tabelle 5.

10 11. Heterozyklische Verbindung oder heterozyklische Verbindungen, dadurch gewinnbar, daß man

- (a) Sorangium cellulosum DSM 10 497 (So ce307) in einem Kohlenstoff- und Stickstoff-Quellen sowie Mineralsalze enthaltenden wässrigen Medium aerob fermentiert, wobei man in an sich bekannter Weise
- 15 (b1) in Abwesenheit eines Adsorberharzes fermentiert und nach der Fermentation ein Adsorberharz zugibt und/oder
- (b2) in Gegenwart eines Adsorberharzes fermentiert,
- (c) jeweils das Adsorberharz mit den durch die Fermentation gebildeten heterozyklischen Verbindungen vom wässrigen Medium abtrennt,
- 20 (d) jeweils das Adsorberharz mit Methanol extrahiert und einer HPLC-Trennung unter folgenden Bedingungen unterwirft:

 Säule: Länge 125 mm und Innendurchmesser 2 mm;
 Trennmaterial: Nucleosil 120-5C18 (Macherey-Nagel, Düren)
 Trenntemperatur: 70 °C;
 25 Laufmittelfluß: 0,5 ml/min;
 Gradient: Methanol/Wasser (45/55) vom Zeitpunkt Null bis zur 7. Minute; anschließend linearer Anstieg auf Methanol/Wasser (70/30) bis zur 20. Minute; bis zur 26. Minute bleibt das Methanol/Wasser-Verhältnis konstant (70/30); bis zur 30. Minute linearer Anstieg auf Methanol/Wasser (90/10);
 Detektion: bei 255,4 nm; und

- 30 — im Fall einer Fermentation gemäß (b1) Fraktionen mit einer Retentionszeit Rt (min) gemäß Fig. 1 gewinnt und/oder
- im Fall einer Fermentation gemäß (b2) Fraktionen mit einer Retentionszeit Rt (min) gemäß Fig. 2 gewinnt und
- (e) die heterozyklischen Verbindungen bzw. die heterozyklische Verbindung isoliert und gewinnt.

35 12. Heterozyklische Verbindung, herstellbar nach dem Verfahren gemäß Anspruch 11 mit Stufe (b1) und gekennzeichnet durch eine Retentionszeit Rt (min) von etwa 1,499.

13. Heterozyklische Verbindung, herstellbar nach dem Verfahren gemäß Anspruch 11 mit Stufe (b1) und gekennzeichnet durch eine Retentionszeit Rt (min) von etwa 3,465.

40 14. Heterozyklische Verbindung, herstellbar nach dem Verfahren gemäß Anspruch 11 mit Stufe (b1) und gekennzeichnet durch eine Retentionszeit Rt (min) von etwa 4,666.

15. Heterozyklische Verbindung, herstellbar nach dem Verfahren gemäß Anspruch 11 mit Stufe (b1) und gekennzeichnet durch eine Retentionszeit Rt (min) von etwa 5,364.

45 16. Heterozyklische Verbindung, herstellbar nach dem Verfahren gemäß Anspruch 11 mit Stufe (b1) und gekennzeichnet durch eine Retentionszeit Rt (min) von etwa 6,018.

17. Heterozyklische Verbindung, herstellbar nach dem Verfahren gemäß Anspruch 11 mit Stufe (b1) und gekennzeichnet durch eine Retentionszeit Rt (min) von etwa 7,419.

50 18. Heterozyklische Verbindung, herstellbar nach dem Verfahren gemäß Anspruch 11 mit Stufe (b1) und gekennzeichnet durch eine Retentionszeit Rt (min) von etwa 8,647.

19. Heterozyklische Verbindung, herstellbar nach dem Verfahren gemäß Anspruch 11 mit Stufe (b1) und gekennzeichnet durch eine Retentionszeit Rt (min) von etwa 9,371.

55 20. Heterozyklische Verbindung, herstellbar nach dem Verfahren gemäß Anspruch 11 mit Stufe (b1) und gekennzeichnet durch eine Retentionszeit Rt (min) von etwa 9,755.

21. Heterozyklische Verbindung, herstellbar nach dem Verfahren gemäß Anspruch 11 mit Stufe (b1) und gekennzeichnet durch eine Retentionszeit Rt (min) von etwa 10,603.

60 22. Heterozyklische Verbindung, herstellbar nach dem Verfahren gemäß Anspruch 11 mit Stufe (b1) und gekennzeichnet durch eine Retentionszeit Rt (min) von etwa 11,946.

23. Heterozyklische Verbindung, herstellbar nach dem Verfahren gemäß Anspruch 11 mit Stufe (b1) und gekennzeichnet durch eine Retentionszeit Rt (min) von etwa 14,868.

65 24. Heterozyklische Verbindung, herstellbar nach dem Verfahren gemäß Anspruch 11 mit Stufe (b1) und gekennzeichnet durch eine Retentionszeit Rt (min) von etwa 15,355.

25. Heterozyklische Verbindung, herstellbar nach dem Verfahren gemäß Anspruch 11 mit Stufe (b1) und gekennzeichnet durch eine Retentionszeit Rt (min) von etwa 17,909.

26. Heterozyklische Verbindung, herstellbar nach dem Verfahren gemäß Anspruch 11 mit Stufe (b1) und gekennzeichnet durch eine Retentionszeit Rt (min) von etwa 22,952.

27. Heterozyklische Verbindung, herstellbar nach dem Verfahren gemäß Anspruch 11 mit Stufe (b1) und gekennzeichnet durch eine Retentionszeit Rt (min) von etwa 26,265.

65 28. Heterozyklische Verbindung, herstellbar nach dem Verfahren gemäß Anspruch 11 mit Stufe (b2) und gekennzeichnet durch eine Retentionszeit Rt (min) von etwa 3,137.

29. Heterozyklische Verbindung, herstellbar nach dem Verfahren gemäß Anspruch 11 mit Stufe (b2) und gekennzeichnet durch eine Retentionszeit Rt (min) von etwa 4,804. 5

30. Heterozyklische Verbindung, herstellbar nach dem Verfahren gemäß Anspruch 11 mit Stufe (b2) und gekennzeichnet durch eine Retentionszeit Rt (min) von etwa 7,080.

31. Heterozyklische Verbindung, herstellbar nach dem Verfahren gemäß Anspruch 11 mit Stufe (b2) und gekennzeichnet durch eine Retentionszeit Rt (min) von etwa 9,346. 10

32. Heterozyklische Verbindung, herstellbar nach dem Verfahren gemäß Anspruch 11 mit Stufe (b2) und gekennzeichnet durch eine Retentionszeit Rt (min) von etwa 10,066.

33. Heterozyklische Verbindung, herstellbar nach dem Verfahren gemäß Anspruch 11 mit Stufe (b2) und gekennzeichnet durch eine Retentionszeit Rt (min) von etwa 10,772. 15

34. Heterozyklische Verbindung, herstellbar nach dem Verfahren gemäß Anspruch 11 mit Stufe (b2) und gekennzeichnet durch eine Retentionszeit Rt (min) von etwa 12,324.

35. Heterozyklische Verbindung, herstellbar nach dem Verfahren gemäß Anspruch 11 mit Stufe (b2) und gekennzeichnet durch eine Retentionszeit Rt (min) von etwa 14,442. 20

36. Heterozyklische Verbindung, herstellbar nach dem Verfahren gemäß Anspruch 11 mit Stufe (b2) und gekennzeichnet durch eine Retentionszeit Rt (min) von etwa 17,976.

37. Heterozyklische Verbindung, herstellbar nach dem Verfahren gemäß Anspruch 11 mit Stufe (b2) und gekennzeichnet durch eine Retentionszeit Rt (min) von etwa 21,181.

38. Heterozyklische Verbindung, herstellbar nach dem Verfahren gemäß Anspruch 11 mit Stufe (b2) und gekennzeichnet durch eine Retentionszeit Rt (min) von etwa 23,899. 25

39. Heterozyklische Verbindung, herstellbar nach dem Verfahren gemäß Anspruch 11 mit Stufe (b2) und gekennzeichnet durch eine Retentionszeit Rt (min) von etwa 27,894.

40. Verfahren zur Gewinnung einer oder mehrerer heterozyklischer Verbindungen, dadurch gekennzeichnet, daß man 30

- (a) *Sorangium cellulosum* DSM 10 497 (So ce307) in einem Kohlenstoff- und Stickstoff-Quellen sowie Mineralsalze enthaltenden wässrigen Medium aerob fermentiert, wobei man in an sich bekannter Weise
- (b1) entweder in Gegenwart eines Adsorberharzes fermentiert oder
- (b2) nach der Fermentation ein Adsorberharz zugibt,
- (c) das Adsorberharz mit den durch die Fermentation gebildeten heterozyklischen Verbindungen vom wässrigen Medium abtrennt,
- (d) das abgetrennte Adsorberharz mit Methanol eluiert,
- (e1) das dabei zuerst anfallende stark wasserhaltige Eluat — einengt,
- die anfallende wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert und
- die Dichlormethanphase trocknet und zu einem Konzentrat einengt
- (e2) das restliche, weniger wasserhaltige Eluat zu einem Konzentrat einengt und mit dem gemäß (e1) angefallenen Rückstand vereinigt,
- (f) die vereinigten Konzenerate mit Heptan extrahiert und von Lipiden befreit,
- (g) den angefallenen Hexan-Extrakt mit Methanol re-extrahiert,
- (h) den methanolischen Extrakt an Kieselgel mit Methanol eluiert,
- (i) das angefallene methanolische Eluat einer HPLC-Trennung an einer Umkehrphase unterwirft, wobei man als Laufmittel ein Methanol/Wasser-Gemisch und danach Methanol verwendet und vier Fraktionen gewinnt,
- (j) die gewonnenen Fraktionen jeweils einer MPLC-Trennung an einer Umkehrphase insbesondere unter den folgenden Bedingungen unterwirft: 45

Säule: Länge 460 mm und Innendurchmesser 40 mm;

Trennmaterial: YMC-RP 18, 120, 15 bis 25 µm;

Laufmittel: Methylalkohol/Wasser (75/25 oder 80/20);

Detektion: bei 254 nm;

eine oder mehrere Fraktionen mit einem Gehalt an heterozyklischer Verbindung bei 254 nm detektiert und isoliert und

(k) aus einer isolierten Fraktion jeweils eine heterozyklische Verbindung isoliert und gewinnt. 50

41. Mittel gegen pathogene Pilze und/oder Hefen, gekennzeichnet durch einen Gehalt an einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 39 neben einem üblichen Träger und/oder Verdünnungsmittel. 55

42. *Sorangium cellulosum* DSM 10 497.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

60

65

- Leerseite -

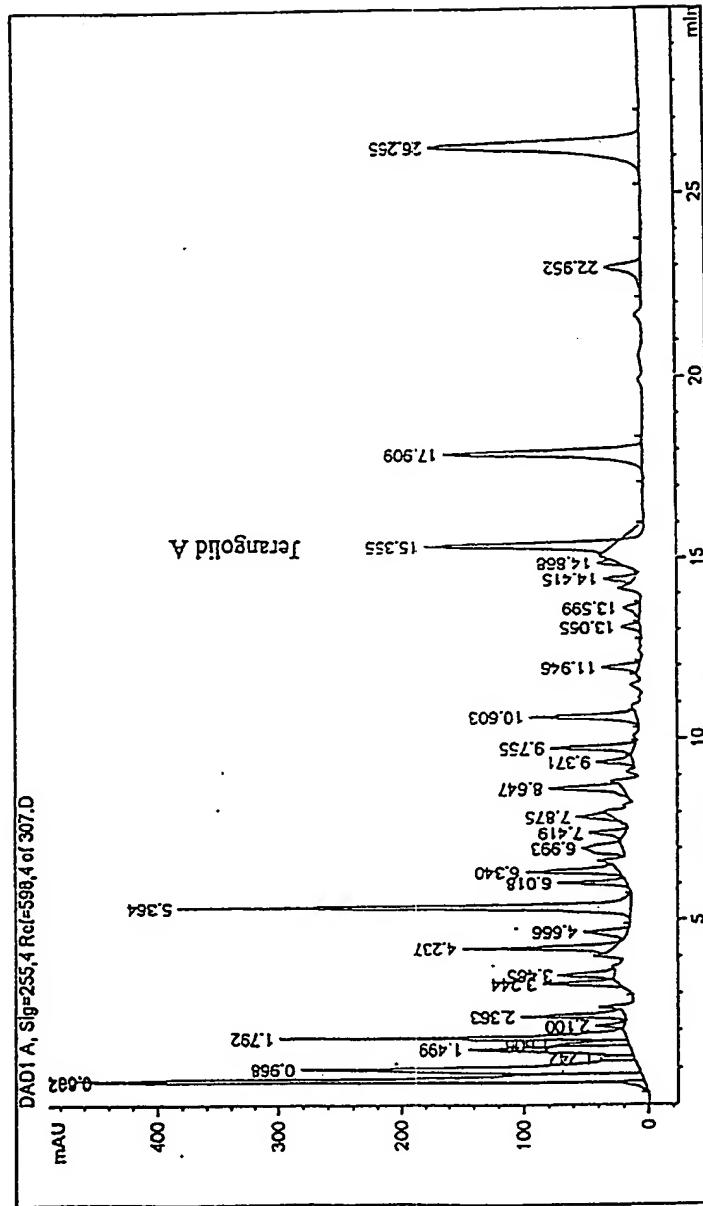


Abb. 1

Peaks mit den folgenden Retentionszeiten werden verursacht durch Jerangolid bzw. Verbindungen mit einem Absorptionspektrum, das mit dem von Jerangolid A identisch oder diesem sehr ähnliches ist. Rt [min]: 1.499, 3.465, 4.666, 5.364, 6.018, 7.419, 8.647, 9.371, 9.755, 10.603, 11.946, 14.868, 15.355, 17.909, 22.952, 26.265.

Nummer:

DE 196 07 702 A1

Int. Cl.⁶:

C 07 D 309/32

Offenlegungstag:

4. September 1997

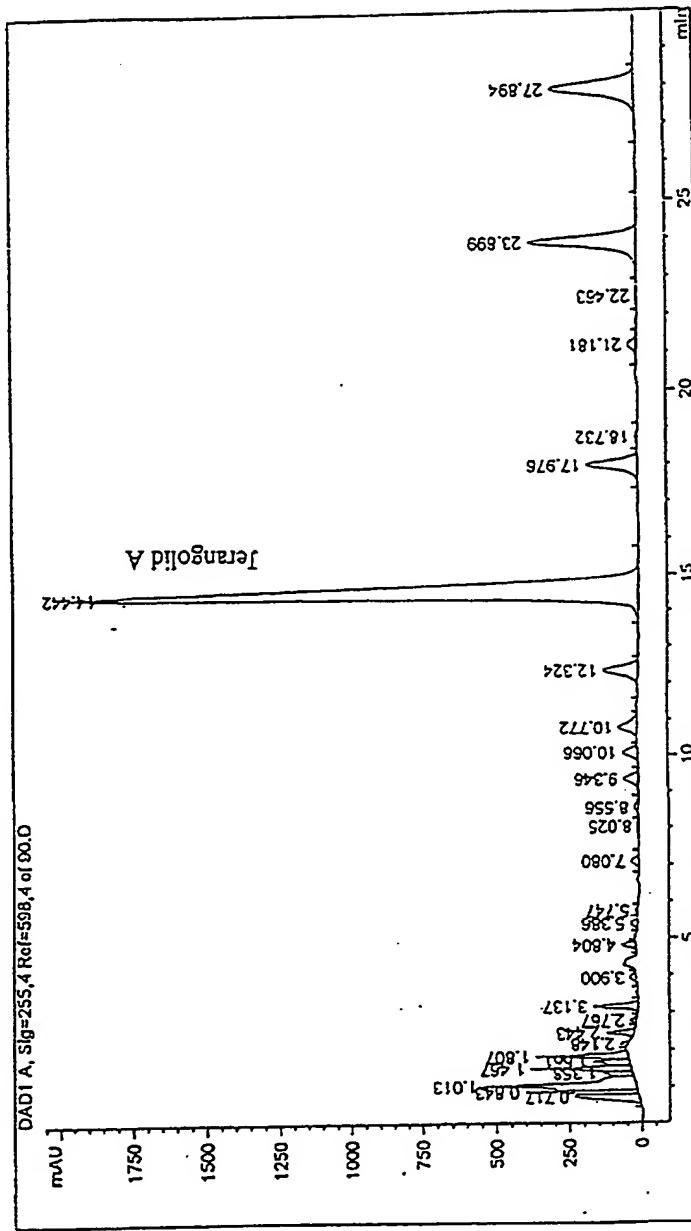


Abb. 2

Peaks mit den folgenden Retentionszeiten werden verursacht durch Jerangolid bzw. Verbindungen mit einem Absorptionspektrum, das mit dem von Jerangolid A identisch oder diesem sehr ähnliches ist. Rt [min]: 3.137, 4.804, 7.080, 9.346, 10.066, 10.772, 12.324, 14.442, 17.976, 21.181, 23.899, 27.894

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.